

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00956

• 综 述 •

蛋白激酶 C 对内向整流钾离子通道的调节机制

张 璇¹, 耿 仙^{1,2}, 陈兴娟¹, 杨冀杰¹, 杜肖娜¹, 张海林^{1*}

1. 河北医科大学基础医学院药理学教研室, 石家庄 050017

2. 河北大学基础医学院药理学教研室, 保定 071000

[摘要] 内向整流钾离子(Kir)通道是在很多组织中广泛分布的一种钾离子通道,在维持钾离子平衡电位、调节细胞兴奋性和胰岛素分泌等方面发挥着重要的作用。Kir 通道是众多调节因素作用的靶点,这些因素包括:K⁺、Mg²⁺、pH、ATP、G 蛋白偶联受体(GPCR)、磷脂酰肌醇 4,5 二磷酸(PIP₂)、蛋白激酶 A(PKA)、蛋白激酶 C(PKC)、花生四烯酸(AA)等。由于很多细胞外信号是通过 PKC 信号转导通路来调控 Kir 通道的,多年来为了更好地界定 PKC 在调控 Kir 通道功能中所扮演的角色及机制,人们进行了大量而深入的研究。本文对 PKC 调节 Kir 通道机制的研究进展及目前提出的一些新观点进行综述。

[关键词] 蛋白激酶 C; 内向整流钾通道; 磷脂酰肌醇 4,5 二磷酸; 调节机制

[中图分类号] R 33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)08-0956-05

Modulation mechanism of PKC upon inwardly rectifying potassium channels

ZHANG Xuan¹, GENG Xian^{1,2}, CHEN Xing-juan¹, YANG Ji-jie¹, DU Xiao-na¹, ZHANG Hai-lin^{1*}

1. Department of Pharmacology, College of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

2. Department of Pharmacology, College of Basic Medicine, Hebei University, Baoding 071000

[ABSTRACT] Inwardly rectifying potassium (Kir) channels are widely distributed in many tissues and play important roles in physiological processes such as maintaining K⁺ homeostasis, regulating cell excitability and insulin secretion. The activity of Kir channels is regulated by a number of modulators, such as K⁺, Mg²⁺, pH, ATP, GPCR, PIP₂, PKA, PKC, AA (arachidonic acid), etc. Study of the regulating mechanisms of Kir channel is a key step in understanding the physiology and pathophysiology of these channels. Because many extra molecular signals regulate Kir channels *via* PKC pathway, much effort has been made over the past decade to understand role of PKC in regulating Kir channels. This paper summarizes the molecular basis of PKC modulation of Kir channels and the recent progression on the area.

[KEY WORDS] protein kinase; inwardly rectifying potassium channels; phosphatidylinositol 4, 5-diphosphate; modulation mechanism

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(8):956-960]

内向整流钾离子通道(inwardly rectifying potassium channels, Kir channels)最早由 Bernard Katz 于 1949 年在骨骼肌细胞上发现,是由 7 个亚家族(Kir1. X-7. X)组成的一个超家族,目前在哺乳动物中已经发现 15 个成员^[1-2]。Kir 通道在组织中分布广泛,在维持钾离子平衡电位、调节细胞兴奋性和胰岛素分泌等方面发挥着重要的作用。Kir 通道是众多调节因素和第二信使作用的靶点,这些因素包括:K⁺、Mg²⁺、pH、ATP、G 蛋白偶联受体(GPCR)、花生四烯酸(arachidonic acid, AA)、磷脂酰肌醇 4,5 二磷酸(PIP₂)、蛋白激酶 A(PKA)、蛋白激酶 C(PKC)等,对其功能调节机制的

认识是了解其生理学和生理病理学意义的关键所在^[3-6]。

许多神经递质、激素等可通过其受体激活 G_{q/11} 蛋白,进而激活磷脂酶 C(PLC)水解 PIP₂,生成肌醇三磷酸(IP₃)、二酰甘油(DAG),并由此释放细胞内 Ca²⁺,激活 PKC,调控 Kir 通道功能。PKC 和 PIP₂ 都被认为是 G_{q/11} 偶联受体介导的 Kir 通道功能改变的重要调节因子^[5-8]。早期的研究主要探讨的是 PKC 是否通过磷酸化通道而改变其功能,但随着人们对细胞膜磷脂 PIP₂ 本身直接调节通道蛋白功能的关注,并发现很多离子通道都是 PIP₂ 依赖性的,新的观点认为 PIP₂ 可能是膜受体(连同其他调节因素,如 PKC)调节 Kir 通道功

[收稿日期] 2008-12-09 **[接受日期]** 2009-04-13

[基金项目] 国家自然科学基金(30730031,30500112),国家重点基础研究发展计划(973 计划,2007CB512100)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30730031,30500112) and National Program on Key Basic Research Projects (973 Program,2007CB512100)。

[作者简介] 张 璇, 硕士生, E-mail: zhangxuan9999@sohu.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:0311-86266342, E-mail: zhanghl@hebm. edu. cn

能的关键^[4-5]。目前研究者思考的一个主要问题是:PKC对通道的调节与 PIP_2 对通道的调节之间存在着怎样的关系。PKC对Kir通道的功能的调节机制一直是过去几十年来研究和讨论的焦点,下面对人们的研究结果和提出的主要观点进行总结和讨论。

1 Kir通道亚家族的结构特征、组织分布和功能

Kir具有共同的基本结构,即通道每个亚单位含2个跨膜区(M1,M2)和1个孔区(P环),N末端起始于细胞内,经2次跨膜折叠后,C末端结束于细胞内,4个亚单位组成四聚体,形成功能性Kir通道^[9]。

目前为止,发现Kir通道含有7个亚家族(Kir1.X-7.X),它们分布广泛,通过维持细胞膜电位及兴奋性发挥着广泛的生理功能。例如:Kir1.1(ROMK1)主要在肾脏表达,可调控肾脏钾分泌^[10]。Kir2.1(IRK1)主要在心脏表达,被认为是心脏内向整流钾通道电流(IK1)的分子学基础。Kir2.2也主要表达在心脏,调控心肌动作电位的静息期。Kir2.3(HIR)主要在前脑表达^[11-12]。Kir3.0(GIRK)主要在心脏和脑表达,具有调节心律、维持静息膜电位和抑制激素释放的作用,其中Kir3.1/Kir3.4被认为是 K_{Ach} 的分子学基础。Kir4.0主要在脑和肾脏表达,具有维持肾脏的钾稳态作用^[13]。Kir5.1单独表达,不能产生功能性钾通道。Kir6.1或Kir6.2与磺酰脲受体(SUR)共表达是 K_{ATP} 通道的分子学基础,具有调节血管张力、细胞膜兴奋性和胰岛素分泌等作用^[14]。Kir7.1主要在脑组织中表达,具有维持细胞静息膜电位的作用^[2]。

2 PKC的分类、结构特征和组织分布

PKC是1977年首先在鼠脑的胞质成分中发现的一种具有磷脂和钙依赖性的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是细胞内信号转导的重要递质,迄今为止,已分离纯化出12种亚型。根据其同工酶的结构特点和激活剂的不同,通常把PKC分为3类:(1)钙依赖型(或经典型;cPKCs):由 α 、 β_1 、 β_2 、 γ 组成,是最早发现的亚型,激活时需要 Ca^{2+} ,DG和磷酸酰丝氨酸(PS)或佛波醇酯(PMA);(2)钙不敏感型(或新型;nPKCs):由 δ 、 ϵ 、 η 、 θ 组成,不需要 Ca^{2+} ,但需要DG和磷脂或PMA;(3)非典型型(aPKCs):由 ζ 、 λ 、 ι 组成,其活性不依赖 Ca^{2+} 、DG和PMA,仅需磷脂类物质就可激活。此外,新发现的一种PKC μ 被归为PKD家族^[15]。

PKC的各种亚型由737~872个氨基酸残基构成的单链多肽,相对分子质量约为80 000。其N端为调节结构域,C端为催化结构域,两者通过一个可被蛋白酶水解的“铰链区”连接。它含有4个保守区(C1-C4)和5个可变区(V1-V5),每一保守区相当于一个功能元件,某些可变区也具有部分功能调节作用^[16]。

PKC组织分布广泛,且各亚型的分布具有特异性。例如:PKC α 、 δ 和 ζ 几乎在所有组织中都有表达,而 γ 仅在中枢

神经系统和脊髓表达。PKC亚型的组织分布特异性提示它们在功能上的差异。

3 PKC调节Kir通道的机制

近年来研究发现PKC各亚型在调节生命活动中发挥着至关重要的作用。PKC可激活受体(如表皮生长因子受体和胰岛素受体)、细胞骨架蛋白(Map,Tau)、膜蛋白(如钠-氢交换蛋白)、核蛋白(转录因子,起始因子)信号转导物(鸟苷酸环化酶,Raf-1)。由于PKC的作用复杂,关于PKC如何调节Kir通道的分子学机制存在着很多的设想和疑问。

3.1 PKC通过磷酸化通道蛋白调节Kir通道功能 蛋白质可逆磷酸化的调节在信号转导过程中发挥着重要的作用,是细胞生命活动的调控中心。PKC作为一种重要的激酶,参与多种信号转导过程。针对PKC对Kir通道功能的调节是否通过对通道蛋白直接的磷酸化而实现,人们进行了大量而深入的研究。

一些Kir通道的活性可被PKC的激活剂和抑制剂所调控,实验中人们发现PKC的激活往往伴随着向细胞膜的转位,同时观察到通道功能的抑制,所以PKC通过磷酸化通道蛋白调节通道功能的推断被很多人所接受并在一些通道蛋白上得到了证实。通道蛋白作为PKC磷酸化底物的直接证据很少,这方面的证据主要来自点突变结合功能性研究实验。例如,Kir2.1和Kir2.3的同源性很高,但PMA(PKC的激动剂)不能抑制Kir2.1通道,却能很大程度地抑制Kir2.3通道(约50%)。人们通过定向点突变的方法发现Kir2.3 N末端第53位的苏氨酸可能是PKC调控通道活性的关键位点,将其突变为异亮氨酸后丧失PMA敏感性,并且把Kir2.1对应位点的异亮氨酸(I79)突变为苏氨酸后,Kir2.1获得PMA敏感性^[17]。同样,人们发现激活PKC可以抑制Kir6.1/SUR2B,但不抑制Kir6.2/SUR2B。体外磷酸化分析实验显示Kir6.1的C末端的4个丝氨酸(Kir6.2中不含有对应的氨基酸残基)是PKC作用的磷酸化位点,并且将这4个丝氨酸突变后,几乎可以取消激活PKC引起的Kir6.1的抑制^[18]。PKC的激动剂PMA可抑制Kir3通道功能,而激活蛋白磷酸酶后可解除这种抑制。通过生物化学的方法也证明了激活PKC确实引起了Kir3通道磷酸化。通过对通道蛋白系统的突变分析,发现Kir3.1的S185和Kir3.4的S191可能是P物质(SP)引起Kir3通道抑制的主要的PKC磷酸化位点^[19]。

但是这方面的证据并非直接证据,所以结果并不能令人完全信服。这是因为定向点突变不是单纯的只改变PKC磷酸化位点,还可能改变通道的构象或与其他因子之间的相互作用,进而影响通道的功能,而且目前常用的一些有关PKC的工具药物并没有很强的特异性。

3.2 PKC通过 PIP_2 信号系统调节Kir通道蛋白功能 PIP_2 约占细胞膜总磷脂1%,每平方微米细胞膜大约含有3 000~5 000个 PIP_2 分子^[20-21]。很久以来 PIP_2 一直被认为是两个

重要第二信使(IP₃和DAG)的前体,直到近几年PIP₂本身在细胞信号转导中的作用才引起人们的关注。通过大量的实验,人们发现PIP₂可调控很多离子通道、转运体的功能,并参与囊泡转运、胞饮、胞吐等过程^[22-23]。PIP₂对离子通道的调节是人们关注的焦点。人们发现PIP₂可以维持很多离子通道(如Kir家族、M/KCNQ家族、电压门控钙通道等)的功能,表现为激活受体引起PIP₂水解可抑制通道功能。

随着人们对PIP₂的关注和更加深入的研究,PIP₂可能是决定钾离子通道功能调节的最终关键因素的观点被很多研究者所接受。然而对于PKC通过(或联合)PIP₂调节Kir通道功能的具体机制,人们持有不同的观点。

3.2.1 PIP₂-Kir通道亲和力下降是PKC介导的通道功能抑制的最终机制 Zhang等^[24-25]的工作首次阐明了PIP₂与Kir通道相互作用的分子结构基础,2004年的研究^[5]发现PIP₂与Kir通道成员的相互作用的特性决定了众多调节因素(膜受体、PKC、pH、Mg²⁺等)对Kir通道功能调节,提出了PIP₂是控制Kir通道开放的最终门控分子的新观点。这些调节因素可能通过一共有的最终机制来影响钾离子通道功能,即通过影响细胞膜磷脂PIP₂与钾离子通道的相互作用而影响通道功能。另外新的研究^[6]还发现AA调控Kir通道的机制也是通过调节通道与PIP₂的亲和力实现的。

PLC引起的细胞膜PIP₂水解是G_{q/11}偶联受体激活引起的某些Kir通道电流抑制的可能机制,这一观点越来越地被人们所接受,并由此解释了很多实验现象。例如对于Kir2通道,通过阻断PKC不能解除受体介导的通道抑制的实验^[26],证明了PIP₂是Kir通道开放的最终门控分子的观点。但对于一些个别的Kir通道,通过阻断PKC可以解除受体介导的通道抑制。例如:PKC阻断剂staurosporine预孵育可阻断受体激动引起的Kir6.1/SUR2B通道的抑制,但不影响Kir6.2/SUR2B通道^[27-28]。Kir通道家族各成员接受PKC或PIP₂调节的共性和特性如何,其中还有很多值得我们思考和探究的问题。

3.3.2 PKC引起的细胞膜PIP₂的水解是通道功能抑制的机制 一些实验证明,PKC介导的某些Kir通道的抑制是通过调节PIP₂的水解实现的,而不是通过对离子通道本身的磷酸化或调节PIP₂与通道的亲和力实现的。

Zeng等^[29]用薄层层析(TLC)法证明了激活PKC(PMA,300 nmol/L,10 min)引起细胞膜上(³²P)PIP₂含量减少及外源性表达于非洲爪蟾卵母细胞上的ROMK1通道抑制,而用PKC的抑制剂(calphostin C)预处理后的细胞无上述现象,在细胞膜内侧给予PIP₂则可使受抑制的Kir1.1通道电流得到恢复。同样在非洲爪蟾卵母细胞上,给予PMA激活PKC后,发现细胞膜上的PIP₂含量下降(PH-PLC-GFP由胞膜向胞质转位),Kir3.4通道功能受抑制,但不影响与PIP₂有强亲和力的Kir2.1通道(与PIP₂的强亲和力使其对PIP₂量的变化不敏感)。Kir3.4-Kir2.1嵌合体[Kir3.4-Kir2.1-(Lys207-Leu245)]和Kir3.4突变体[Kir3.4

(I229L)]由于与PIP₂的亲和力加强了,所以仅表现出很小的PKC敏感性,并且Kir2.1突变体[Kir2.1(L222I)和Kir2.1(R213Q)]由于与PIP₂的亲和力降低了,获得了PKC敏感性。同时,Kir3.4的PKC磷酸化位点突变并不影响其PKC敏感性^[30]。Nasuhoglu等^[31]利用高效液相色谱法(HPLC)检测到激活PKC(PMA,1 μmol/L,12 min)引起豚鼠心室肌细胞膜上PIP₂水平明显下降(>30%)。

但是早期对PKC的研究^[32]发现,激活PKC可以引起PI-4激酶和PIP-5激酶活性的增加,进而引起细胞膜PIP和PIP₂含量的增加。

3.3 PKC通过其他途径调节Kir通道功能 除了以上提到的观点,还有一些研究结果表明,针对不同的离子通道,PKC引起的通道蛋白磷酸化还可通过其他方式影响通道的功能。例如,PKC可通过磷酸化K_{ATP}通道蛋白降低其与ATP结合的亲和力,提高生理ATP浓度下K_{ATP}通道开放概率,使通道功能增强。PKC可能是作用在形成通道孔区的亚单位(Kir6.2)上第180位高保守的苏氨酸残基(T180)上。辅助亚基SUR1(胰腺)和SUR2(心脏)上也存在相应的位点,虽然这些位点也可能是PKC作用位点,但它们对通道功能都没有显著的影响。而将Kir6.2第180位苏氨酸突变后,PKC催化的通道蛋白磷酸化程度明显降低^[33]。

PKC对K_{ATP}通道的激活作用在局部缺血预处理的保护和胰岛素分泌两方面发挥重要作用^[34-36]。

4 Kir家族的不同成员接受某些特定PKC亚型的调节

研究中发现,不但PKC对Kir各通道的调节机制有所不同,并且某些Kir通道可接受特定种类的PKC亚型的调节。例如,研究发现多功能细胞因子转化生长因子(transforming growth factor-β1,TGFβ1)可通过PLC通路(这里指与磷酸卵磷脂结合的PLC,而不是与磷脂酰肌醇结合的PLC)引起PKC-δ向细胞膜转位,并增加其与Kir2.3通道的亲和力,最终引起Kir2.3通道功能的下调和膜电位的去极化。这个过程中产生了DAG但是没有钙信号的变化,这进一步说明了TGFβ1的作用是通过钙不敏感的新型PKC亚型实现的^[8,37-38]。

Kir3.0家族主要表达在神经、心房和内分泌组织,在突触后抑制(IPSPs)的产生中发挥着重要的作用。当与G_{i/o}偶联的受体被激活后,产生的G_{βγ}二聚体可直接激活Kir3.0通道。在Leaney等^[7]的研究中发现G_{q/11}信号系统也参与了对Kir3.0家族的调节。他们在研究M1和M3受体(均与G_{q/11}偶联)对神经Kir3.1+3.2通道的研究中发现两受体的激活剂引起的通道的抑制可被PMA和DAG所模拟,而PMA的无效结构类似物4α-PMA无此作用。同时HEK293细胞免疫印迹的结果显示PMA可引起PKCδ和PKCε(属于新型/钙不敏感型PKC亚家族)的转位。这个结果显示钙不敏感型PKC参与了对Kir3.1+3.2通道的调节。

另外,PKCε在线粒体K_{ATP}通道介导的缺血预适应的心

脏保护机制中发挥重要作用,而 PKC α 和 δ 并未参与此过程^[39],但也有研究结果显示经典型(依赖钙)和新型(不依赖钙)PKC亚型均参与了缺血后再灌注时对 K_{ATP}通道的开放作用^[40]。关于 PKC ϵ 对线粒体 K_{ATP}通道调节的机制,后来的研究^[41]显示在 COS-7 细胞和心肌细胞激活 PKC ϵ 可引起 K_{ATP}通道中的孔区形成亚单位 Kir6.2 向线粒体膜的转位。

还有研究^[42]结果显示血管紧张素 II (AT II) 可通过 AT1 受体-PKC 通路抑制兔冠状动脉平滑肌细胞上的 Kir。去除细胞内、外钙或使用 PKC α 亚型的特异性阻断剂 G66976 均可降低 AT II 对 Kir 电流的抑制作用,而通过阻断 PKC ϵ 的转位不影响 AT II 的作用。这说明了 AT II 引起的 Kir 电流抑制的机制具有 PKC 亚型性,即主要通过钙依赖的 PKC α 亚型介导。

4 小结

离子通道是生命活动的基础,与细胞的兴奋性直接相关,具有重要的生理功能,对离子通道功能调节的分子机制的研究是生命科学研究的热点,对某些疾病的病因研究也有很大的价值。虽然人们已经在 PKC 对 Kir 通道的调控机制方面进行大量的研究,但仍然存在着许多无法解释的现象。另外,还有研究^[43-45]显示 PIP₂ 可与 PKC 的 C2 区相互作用,可能是 PKC 向细胞膜转位的分子机制,且 PIP₂ 可引起 PKC 的失活。PKC、PIP₂ 和通道之间复杂的相互作用是如何协调、调控 Kir 通道的,还有待研究。总之,有关 PKC 调节 Kir 通道功能的分子机制尚有许多疑问,而这些问题所包含的科学意义远远不仅限于 PKC 对 Kir 通道功能调节的了解,对包括其他离子通道在内的许多相关蛋白的功能调节的理解都具有融会贯通的意义。

[参考文献]

[1] Doupnik C A, Davidson N, Lester H A. The inward rectifier potassium channel family[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 1995, 5: 268-277.

[2] Krapivinsky G, Medina I, Eng L, Krapivinsky L, Yang Y, Clapham D E. A novel inward rectifier K⁺ channel with unique pore properties[J]. *Neuron*, 1998, 20: 995-1005.

[3] Qu Z, Zhu G, Yang Z, Cui N, Li Y, Chanchevalap S, et al. Identification of a critical motif responsible for gating of Kir2.3 channel by intracellular protons[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 13783-13789.

[4] Logothetis D E, Jin T, Lupyán D, Rosenhouse-Dantsker A. Phosphoinositide-mediated gating of inwardly rectifying K⁺ channels[J]. *Pflügers Arch*, 2007, 455: 83-95.

[5] Du X, Zhang H, Lopes C, Mirshahi T, Rohacs T, Logothetis D E. Characteristic interactions with PIP₂ determine regulation of Kir channels by diverse modulators[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 37271-37281.

[6] Wang C, Mirshahi U L, Liu B, Jia Z, Mirshahi T, Zhang H. Arachidonic acid activates Kir2.3 channels by enhancing channel-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate interactions[J]. *Mol*

Pharmacol, 2008, 73: 1185-1194.

[7] Leaney J L, Dekker L V, Tinker A. Regulation of a G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel by a Ca²⁺-independent protein kinase C[J]. *J Physiol*, 2001, 534: 367-379.

[8] Perillan P R, Chen M, Potts E A, Simard J M. Transforming growth factor-beta 1 regulates Kir2.3 inward rectifier K⁺ channels via phospholipase C and protein kinase C-delta in reactive astrocytes from adult rat brain[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 1974-1980.

[9] Doyle D A, Morais Cabral J, Pfuetzner R A, Kuo A, Gulbis J M, Cohen S L, et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity[J]. *Science*, 1998, 280: 69-77.

[10] Hebert S C. Roles of Na-K-2Cl and Na-Cl cotransporters and ROMK potassium channels in urinary concentrating mechanism[J]. *Am J Physiol*, 1998, 275: F325-F327.

[11] Fakler B, Brändle U, Glowatzki E, Weidemann S, Zenner H P, Ruppersberg J P. Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K⁺ channels is caused by intracellular spermine[J]. *Cell*, 1995, 80: 149-154.

[12] Lopatin A N, Makhina E N, Nichols C G. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification[J]. *Nature*, 1994, 372: 366-369.

[13] Hibino H, Horio Y, Inanobe A, Doi K, Ito M, Yamada M, et al. An ATP-dependent inwardly rectifying potassium channel, KAB-2 (Kir4.1), in cochlear stria vascularis of inner ear: its specific subcellular localization and correlation with the formation of endocochlear potential[J]. *J Neurosci*, 1997, 17: 4711-4721.

[14] Aguilar-Bryan L, Clement J P 4th, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A, Bryan J. Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels[J]. *Physiol Rev*, 1998, 78: 227-245.

[15] Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses[J]. *FASEB J*, 1995, 9: 484-496.

[16] Hofmann J. The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C[J]. *FASEB J*, 1997, 11: 649-669.

[17] Zhu G, Qu Z, Cui N, Jiang C. Suppression of Kir2.3 activity by protein kinase C phosphorylation of the channel protein at threonine 53[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 11643-11646.

[18] Shi Y, Cui N, Shi W, Jiang C. A short motif in Kir6.1 consisting of 4 phosphorylation repeats underlies the vascular K_{ATP} channel inhibition by protein kinase C[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 2488-2494.

[19] Mao J, Wang X, Chen F, Wang R, Rojas A, Shi Y, et al. Molecular basis for the inhibition of G protein-coupled inward rectifier K⁺ channels by protein kinase C[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 1087-1092.

[20] McLaughlin S, Wang J, Gambhir A, Murray D. PIP₂ and proteins: interactions, organization, and information flow[J]. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2002, 31: 151-175.

[21] Xu C, Watras J, Loew L M. Kinetic analysis of receptor-activated phosphoinositide turnover[J]. *J Cell Biol*, 2003, 161: 779-791.

[22] Di Paolo G, De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation

- and membrane dynamics[J]. *Nature*, 2006, 443: 651-657.
- [23] Krauss M, Haucke V. Phosphoinositide-metabolizing enzymes at the interface between membrane traffic and cell signaling [J]. *EMBO Rep*, 2007, 8: 241-246.
- [24] Zhang H, He C, Yan X, Mirshahi T, Logothetis DE. Activation of inwardly rectifying K⁺ channels by distinct PtdIns(4,5)P₂ interactions[J]. *Nat Cell Biol*, 1999, 1: 183-188.
- [25] Lopes C M, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, Logothetis D E. Alterations in conserved Kir channel-PIP₂ interactions underlie channelopathies[J]. *Neuron*, 2002, 34: 933-944.
- [26] Carr D B, Surmeier D J. M1 muscarinic receptor modulation of Kir2 channels enhances temporal summation of excitatory synaptic potentials in prefrontal cortex pyramidal neurons[J]. *J Neurophysiol*, 2007, 97: 3432-3438.
- [27] Quinn K V, Cui Y, Giblin J P, Clapp L H, Tinker A. Do anionic phospholipids serve as cofactors or second messengers for the regulation of activity of cloned ATP-sensitive K⁺ channels[J]? *Circ Res*, 2003, 93: 646-655.
- [28] Thorneloe K S, Maruyama Y, Malcolm A T, Light P E, Walsh M P, Cole W C. Protein kinase C modulation of recombinant ATP-sensitive K⁺ channels composed of Kir6.1 and/or Kir6.2 expressed with SUR2B[J]. *J Physiol*, 2002, 541(Pt1): 65-80.
- [29] Zeng W Z, Li X J, Hilgemann D W, Huang C L. Protein kinase C inhibits ROMK1 channel activity *via* a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent mechanism[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 16852-16856.
- [30] Zhang L, Lee J K, John S A, Uozumi N, Kodama I. Mechano-sensitivity of GIRK channels is mediated by protein kinase C-dependent channel-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate interaction[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 7037-7047.
- [31] Nasuhoglu C, Feng S, Mao Y, Shammatt I, Yamamoto M, Earnest S, et al. Modulation of cardiac PIP₂ by cardioactive hormones and other physiologically relevant interventions[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 283: C223-C234.
- [32] Apgar J R. Activation of protein kinase C in rat basophilic leukemia cells stimulates increased production of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: correlation with actin polymerization[J]. *Mol Biol Cell*, 1995, 6: 97-108.
- [33] Light P E, Bladen C, Winkfein R J, Walsh M P, French R J. Molecular basis of protein kinase C-induced activation of ATP-sensitive potassium channels[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 9058-9063.
- [34] Brooks G, Hearse D J. Role of protein kinase C in ischemic preconditioning: player or spectator[J]? *Circ Res*, 1996, 79: 628-630.
- [35] Sato T, O'Rourke B, Marbán E. Modulation of mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels by protein kinase C[J]. *Circ Res*, 1998, 83: 110-114.
- [36] Dunne M J. Phorbol myristate acetate and ATP-sensitive potassium channels in insulin-secreting cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 1994, 267: C501-C506.
- [37] Halstead J, Kemp K, Ignatz R A. Evidence for involvement of phosphatidylcholine-phospholipase C and protein kinase C in transforming growth factor-beta signaling[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 13600-13603.
- [38] Ignatz R A, Honeyman T. TGF-beta signaling in A549 lung carcinoma cells; lipid second messengers[J]. *J Cell Biochem*, 2000, 78: 588-594.
- [39] Ohnuma Y, Miura T, Miki T, Tanno M, Kuno A, Tsuchida A, et al. Opening of mitochondrial K_{ATP} channel occurs downstream of PKC-epsilon activation in the mechanism of preconditioning[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 283: H440-H447.
- [40] Ito K, Sato T, Arita M. Protein kinase C isoform-dependent modulation of ATP-sensitive K⁺ channels during reoxygenation in guinea-pig ventricular myocytes[J]. *J Physiol*, 2001, 532: 165-174.
- [41] Garg V, Hu K. Protein kinase C isoform-dependent modulation of ATP-sensitive K⁺ channels in mitochondrial inner membrane[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293: H322-H332.
- [42] Park W S, Kim N, Youm J B, Warda M, Ko J H, Kim S J, et al. Angiotensin II inhibits inward rectifier K⁺ channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells through protein kinase Calpha[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341: 728-735.
- [43] Huang F L, Huang K P. Interaction of protein kinase C isozymes with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266: 8727-8733.
- [44] Sánchez-Bautista S, Marín-Vicente C, Gómez-Fernández J C, Corbalán-García S. The C2 domain of PKCalpha is a Ca²⁺-dependent PtdIns(4,5)P₂ sensing domain; a new insight into an old pathway[J]. *J Mol Biol*, 2006, 362: 901-914.
- [45] Guerrero-Valero M, Marín-Vicente C, Gómez-Fernández J C, Corbalán-García S. The C2 domains of classical PKCs are specific PtdIns(4,5)P₂-sensing domains with different affinities for membrane binding[J]. *J Mol Biol*, 2007, 371: 608-621.